

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ime i prezime studenta : Ana-Marija Damjanović

Prediplomski studij smjera : Bilinogojstvo

UTJECAJ HRANJIVIH PODLOGA I ETERIČNIH ULJA NA
RAZVOJ *BOTRYTIS CINEREA*

Završni rad

Osijek, 2013.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ime i prezime studenta : Ana-Marija Damjanović

Preddiplomski studij smjera : Bilinogojstvo

**UTJECAJ HRANJIVIH PODLOGA I ETERIČNIH ULJA NA
RAZVOJ *BOTRYTIS CINEREA***

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, mentor
3. prof. dr. sc. Nada Parađiković, član

Osijek, 2013

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. SIVA PLIJESAN SUNCOKRETA	2
1.2. SIVA PLIJESAN VINOVE LOZE	3
1.2.3. SIVA PLIJESAN JAGODE	4
2. MATERIJAL I METODE.....	6
2.1. BIO-TEST NA JAGODAMA	6
2.2. UTJECAJ ETERIČNIH ULJA NA RAZVOJ GLJIVE BOTRYTIS CINEREA	7
2.3. ISPITIVANJE UTJECAJA HRANJIVIH PODLOGA I TEMPERATURE NA RAZVOJ GLJIVE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	8
2.4. PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA	9
3. REZULTATI I RASPRAVA	11
3.1. BIO-TEST NA JAGODAMA	11
3.2. UTJECAJ ETERIČNIH ULJA NA RAZVOJ GLJIVE BOTRYTIS CINEREA	12
3.3. UTJECAJ HRANJIVIH PODLOGA I TEMPERATURE NA RAZVOJ GLJIVE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	20
4. ZAKLJUČAK	22
5. POPIS LITERATURE	23
6. SAŽETAK.....	24
7. SUMMARY	25
8. POPIS TABLICA.....	26
9. POPIS SLIKA	27
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	288

1. UVOD

Gljiva *Botrytis cinerea* jedan je od najznačajnijih uzročnika bolesti kako u uzgoju u zaštićenim prostorima tako i u poljskim uvjetima uzgoja. U povoljnim uvjetima za razvoj gljive gubici prinosa mogu biti veći i od 50%. Uzročnik je bolesti poznate pod nazivom siva plijesan, ubikvist je i polifag. Parazitira velik broj različitih biljnih vrsta kao što su suncokret, uljana repica, krastavci, salata, rajčica, bundeve, vinova loza, jagode, maline, luk, ruže. *Botrytis cinerea* je konidijski (nespolni, anamorfn) stadij teleomorfa *Botryotinia fuckeliana* (spolni stadij). Prema spolnom stadiju gljiva pripada odjelu *Eumycota*, odnosno prave gljive, pododjelu *Ascomycota*, razredu *Discomycetes*, porodici *Sclerotiniaceae*, rodu *Botryotinia*. Pododjel *Ascomycota* se dijeli na razrede prema tome da li gljive imaju ili nemaju plodište te ako ga imaju kakav je njegov oblik. Za gljive iz razreda *Discomycetes* karakteristično je da imaju otvoreno plodište koje se naziva apotecij. Ono je plitko, zdjeličasto i potpuno otvoreno. Većina pripadnika ovog razreda su fakultativni paraziti, a u saprofitskoj fazi se formira spolni stadij gljive – apotecij, dok je parazitski konidijski stadij. Rod *Botrytis* stvara sklerocije u ili na tkivu domaćina, a sklerocije su tvorevine nastale gustim spletanjem hifa i njihovim spajanjem.

Dakle, tijekom vegetacije gljiva formira konidijski stadij koji pričinjava štete u biljnoj proizvodnji dok pred kraj vegetacije stvara sklerocije kao konzervacijske organe ili može preživjeti nepovoljne uvjete kao micelij na zaraženim biljnim ostacima. U proljeće na sklerocijama se stvaraju micelij s konidioforima i konidijama, ili se rjeđe formiraju apoteciji s askusima i askosporama.

Oboljeti mogu svi nadzemni dijelovi biljaka, a simptomi ovise o domaćinu i organu biljke koji je zaražen. Simptomi mogu biti različiti od pjega na listovima, laticama i braktejama do truljenja plodova te paleži ili »raka« na stabljikama. Na infekciju je osjetljivije fiziološki starije i na bilo koji način oštećeno tkivo. Simptome napada lako ćemo prepoznati jer gljiva o na zaraženim organima formira obilne, sive, pahuljaste prevlake. Prevlaka se razvija pri visokoj relativnoj vlazi zraka, a sastoji se iz dugačkih, u gornjoj trećini razgranatih, konidiofora čiji je vrh proširen i na njemu se formira obilje jednostaničnih, ovalnih ili okruglih konidija. U epidemiologiji sive plijesni spolni stadij je malo značajan i rijetko se nalazi u prirodi. Infekcija biljaka nastaje kroz prirodne otvore ili rane, a za klijanje konidija i infekciju je potrebna kap vode ili relativna vlaga zraka iznad 90% i temperatura 15-20°C.

Gljiva preživljava kao saprofit, za kratko vrijeme stvara obilje konidija koje se lagano raznose zračnim strujanjima te je njezino suzbijanje otežano. Dobre rezultate u borbi sa ovom bolesti daju fitosanitarne mjere, kontrola okolinskih uvjeta, agrotehničke mjere i primjena fungicidnih pripravaka, a preporučuje se uklanjanje izvora zaraze.

1.1. SIVA PLIJESAN SUNCOKRETA

U godinama s većom količinom kiše u drugom dijelu vegetacije siva plijesan se javlja u jačem intenzitetu. Suncokret može biti inficiran tijekom cijelog razvoja, a broj zaraženih biljaka i jačina zaraze ovisi o tolerantnosti domaćina, količini oborina, relativnoj vlažnosti zraka i temperaturi. Gljiva zaražava lišće, peteljke, stabljiku (slika 1) i glave suncokreta. Simptomi su tamne pjege koje za 5-6 dana iza pojave prekriva gusta siva prevlaka. Infekcija nastaje kroz oštećena tkiva, ali i preko potpuno neoštećene kore. Napadnuta tkiva su razmekšana, dolazi do venuća lišća i peteljki, a stabljike se mogu polomiti. U životnom ciklusu gljiva formira micelij, konidiofore s konidijama, sklerocije, apotecije, askuse i askospore, a prema nekim autorima formiraju mikrokonidije i hlamidiospore koje su potvrđene i kod nas (Topolovec-Pintarić, 2000.). Bolest se širi pomoću konidija koje raznose zračne struje. Za njihov razvoj potrebna je kap vode ili visoka relativna vlažnost zraka (preko 90%) i širok raspon temperatura. Minimalna temperatura je 2-5°C, optimalna 20-25°C, a maksimalna 39-41°C. Uz nisku relativnu vlažnost zraka i temperaturu od oko 25°C konidije ostaju vitalne nekoliko mjeseci. Osnovne mjere za suzbijanje sive plijesni su sjetva otpornijih genotipova, zdravog i dezinficiranog sjemena, višegodišnji plodored te duboko zaoravanje zaraženih biljnih ostataka.



Slika 1. Siva plijesan na stabljici suncokreta (Katedra za fitopatologiju)

1.2. SIVA PLIJESAN VINOVE LOZE

Siva plijesan je tipična bolest vinove loze "visokog" standarda, odnosno intenzivnog uzgoja. Na vinovoj lozi ova gljiva uzrokuje izravne i neizravne štete. Izravne se štete očituju smanjenjem uroda u prosjeku od 5 do 7%, ali one mogu biti i znatno veće. Drugi oblik šteta očituje se u lošoj kakvoći mošta. Gljiva iz zaraženih bobica troši veću količinu šećera i vinsku kiselinu, pa prevladava jabučna kiselina, koja smanjuje dobar okus vina. U dužem periodu vlažnijeg razdoblja gljiva može inficirati sve zelene dijelove. Na listu se pojavljuje žućkasta pjega koja kasnije postane smeđa, a najčešće pjega ostaje nezamijećena jer se u većini slučajeva zasušila. Za vrijeme obilne vlage na zelenim izbojima gljiva izaziva truljenje vrha mladice, a tkivo oko nodija postaje vodenasto, mekano i lako se lomi na mjestu nodija. Ako u vrijeme cvatnje nastupi zaraza cvatova, oni dobiju vodenkast izgled, a zatim potamne. Pri visokoj relativnoj vlažnosti zraka i temperaturi oko 15°C javlja se sporulacija, a kada temperatura poraste zaraženi cvatovi se osuše i otpadnu. Na grozdovima (slika 2), krajem lipnja ili početkom srpnja, pojedine bobice i peteljkovine poprime smeđu boju, na kojima se javlja paučinasta prevlaka. Obično se zaražene bobice nalaze u unutrašnjosti grozda pa zaraza prelazi na susjedne bobice i peteljke. Bolest se najčešće javlja u jesen pred zriobu bobica. Zaražene bobice poprimaju smeđu boju, a na pojedinim bobama nastaje siva baršunasta prevlaka koja se sastoji od konidiofora i konidija. U povoljnim uvjetima bolest se brzo širi na zdrave bobice te ih prekriva sivom paučinastom prevlakom. Tako može biti zahvaćen dio grozda ili čitav grozd, što se često događa kod sorata zbijenog grozda. Gljiva može preživjeti na rozgvi ispod kore u obliku micelija ili sklerocija, osušenim listovima, rozgvi na tlu, u pupovima. Neki izolati stvaraju obilje sklerocija pa u proljeće na sklerocijama nastaju konidije. Cvjetovi mogu biti zaraženi dok su još neotvoreni ili u cvatnji. Zaraženi cvjetovi brzo propadaju ili se zaraza ne može širiti dalje jer je zaustavljena obrambenim reakcijama domaćina. Za razvoj gljive su potrebne temperature 20-30°C, a optimalne su 20-23°C. Od mjera borbe preporučavaju se preventivne mjere, ali je uporaba fungicida neizostavna mjera u intenzivnoj proizvodnji.



Slika 2. Siva plijesan na vinovoj lozi (Katedra za fitopatologiju)

1.2.3. SIVA PLIJESAN JAGODE

Naša najčešća i najopasnija bolest plodova jagode koja, ako za vrijeme berbe padnu jake kiše, može uništiti više od 50% uroda. Gljiva zaražava cvjetnu stapku, cvijet, peteljku lista, list i plod. Zaraženi cvjetovi izgledaju kao spaljeni, a gljiva se zadržava na osušenim prašnicima, oštećenim laticama i tučku. Infekcija najčešće nastaje na mjestu gdje je tek formirani plod vezan za čašku, a simptomi će se pojaviti pred berbu. Na zelenim plodovima se primjećuje svijetlosmeđa pjega, a plod je na tom mjestu mekan. Takva zaraza je djelomična tj. zaraženi su samo neki oraščići na mesnatom usplođu. Zaraza se često javlja kod plodova koji dodiruju tlo, foliju ili se međusobno dodiruju ili ako su na bilo koji način ozlijeđeni. Na zaraženim plodovima se vidi svijetlosmeđa pjega, koja kasnije poprimi maslinastosivu boju. Inficirani plodovi imaju promjenjen okus, a na dijelu na kojem nema micelija su tamnosmeđe boje. Infekcija može nastupiti u razdoblju cvatnje, a nakon zaraze latica i naseljavanja gljive na prašnike nastaje sporulacija. U povoljnim uvjetima konidije gljive (slika 3) počinju klijeti u infekcijsku hifu koja prorasta vrat tučka i raste prema cvjetištu, a zatim pomoću penetracijske

hife prelazi u plod. Prodor infekcijske hife od tučka do ploda u povoljnim uvjetima traje 7 dana. S prašnika gljiva preko drška prašnika prodire do cvjetne čaške, a potom se naseljava u unutrašnjost zelenih plodova. Infekcija ploda može nastati i izravnim putem. Izravna zaraza ploda najčešće nastaje pred berbu, a može nastati i u transportu. Uporaba fungicida je iznimno važna mjera zaštite, a ukoliko ne postoji prognozna služba preporučuju se 4 tretiranja i to: prvo prskanje trebamo obaviti u početku cvatnje, drugo u punoj cvatnji, treće u završetku cvatnje i zamaćanju plodova, a četvrto u vrijeme početka zriobe. U četvrtoj aplikaciji moramo voditi računa o karenci.



Slika 3. Konidiofori i konidije *Botrytis cinerea* (Katedra za fitopatologiju)

2. MATERIJAL I METODE

2.1. BIO-TEST NA JAGODAMA

Na dezinficiranom laboratorijskom stolu sam pripremila šest Petrijevih zdjelica, staklenu čašu, jagode, mikropipetu, Petrijevu zdjelicu u kojoj se formirala čista kultura gljive *Botrytis cinerea*, sterilni skalpel, nož za rezanje jagoda, stakleni štapić za miješanje suspenzije za inokulaciju i destiliranu vodu. Na PDA podlozi (potato-dextrose agar) smo uzgojili gljivu *Botrytis cinerea*. Uzela sam staklenu čašu i u nju stavila malo destilirane vode. Predhodno steriliziranim skalpelom sam s PDA podloge sastrugala gljivu i prenijela ju u čašu s destiliranom vodom. Sve sam promiješala staklenim štapićem kako bih dobila suspenziju spora u vodi koja se koristi za inokulaciju plodova jagoda. Predhodno kupljenje jagode sam uzdužno nožem rasjekla na dva jednaka dijela i stavila po dvije polovice u Petrijevu zdjelicu.. Zatim sam s mikropipetom uzela 2 μ l suspenzije u kojoj su se nalazile spore gljive *Botrytis cinerea* i izvršila umjetnu infekciju jagoda (slike 4 i 5). Po dvije Petrijeve zdjelice stavila na tri različite temperature. Prve dvije zdjelice bile su u hladnjaku na temperaturi 5°C, druge dvije bile su u termostatu na temperaturi 15°C, a posljednje dvije zdjelice su bile na sobnoj temperaturi (25°C). Razvoj bolesti sam pratila kroz tri dana.



Slika 4. Inokulacija jagoda



Slika 5. Inokulacija jagoda

2.2. UTJECAJ ETERIČNIH ULJA NA RAZVOJ GLJIVE BOTRYTIS CINEREA

Za provođenje ovog pokusa bile su mi potrebne 24 Petrijeve zdjelice u kojima se nalazi prethodno pripremljena PDA podloga, filter papir, 11 vrsta eteričnih ulja (slika 6), destilirana voda, etilni alkohol, plamenik, pinceta, igla, čista kultura gljive *Botrytis cinerea*, čaša s alkoholom, mikropipeta i vata. U pokusu su korištena sljedeća eterična ulja: *Mentha x piperita* (metvica), *Lavandula angustifolia* ssp. *angustifolia* (lavanda)), *Thymus vulgaris* (timijan), *Eugenia caryophyllus* (klinčićevac), *Rosmarinus officinalis* (ružmarin), *Salvia officinalis* (kadulja), *Carum carvi* (kim), *Pimpinella anisum* (anis), *Cinnamomum verum* (list cimeta), *Citrus aurantium* ssp. *amara* (gorka naranča) i *Pinus sylvestris* (bor). Nakon što sam uključila komoru za rad u čistom (laminarij) namočila sam vatu etilnim alkoholom i njime dezinficirala radnu površinu u kojoj sam obavljala pokus. Nakon dezinfekcije sam uzela 24 Petrijeve zdjelice s PDA podlogom te sam na svaku zdjelicu ucrtala 5 točki po određenoj šabloni. U sredini se nalazila točka za filter papir, a 4 točke uz rub su bile za naciepljivanje gljive. Svaku vrstu eteričnog ulja sam stavljala u dvije Petrijeve zdjelice, a kao kontrolu sam koristila destiliranu vodu koju sam također stavila u dvije zdjelice. U svaku Petrijevu zdjelicu na sredinu sam stavila steriliziranom pincetom okrugli komadić filter papira promjera 5 mm. Kada sam to obavila uzela sam mikropipetom 5 μ l eteričnog ulja i stavljala na filter papir. Proces sam ponovila sa svih 11 vrsta ulja i s destiliranom vodom. Nakon aplikacije eteričnih ulja i destilirane vode na filter papir uzela sam laboratorijsku iglu iz čaše s alkoholom, stavila ju na plamenik da se užari i time ju sterilizirala. Uzela sam Petrijevu zdjelicu u kojoj se nalazila čista kultura gljive *Botrytis cinerea* i lagano sastrugala micelij, a zatim sam prateći nacrtanu šablonu naciepljivala gljivu na PDA podlogu. Naciepljene PDA podloge sam stavila u termostat komoru na 20°C i 25°C. Nakon što sam završila pokus, laboratorijski pribor kojim

sam se koristila je steriliziran i vraćen na mjesto. Razvoj gljive sam pratila tijekom 9 dana, a vremenski razmak između naciepljivanja i prvog mjerenja je bio 3 dana, između prvog i drugog mjerenja je bio također 3 dana kao i između drugog i trećeg mjerenja. Mjerenje zone inhibicije sam obavljala tako što sam od filter papira na kojemu se nalazilo eterično ulje ili destilirana voda, pomoću ravnala izmjerila prostor od filter papira do ruba micelija gljive i tako utvrdila.

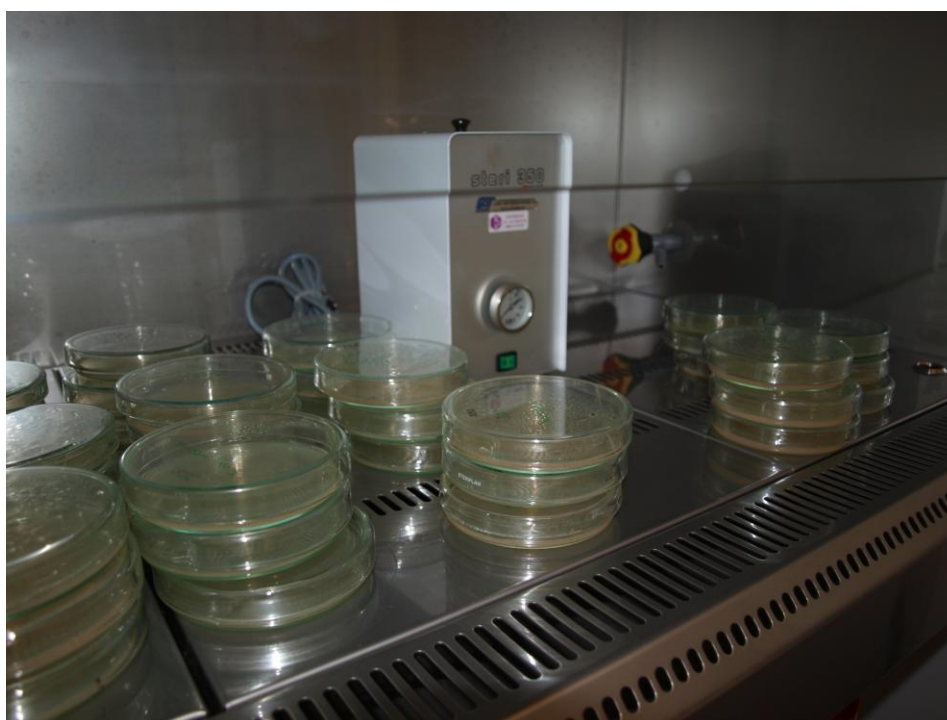


Slika 6. Eterična ulja

2.3. ISPITIVANJE UTJECAJA HRANJIVIH PODLOGA I TEMPERATURE NA RAZVOJ GLJIVE *BOTRYTIS CINEREA*

Za obavljanje ovog pokusa bilo mi je potrebno 12 Petrijevih zdjelica s hranjivom podlogom od mrkve, 12 Petrijevih zdjelica s PDA (krumpirova) podlogom, 12 Petrijevih zdjelica s V8 (rajčica) podlogom i 12 Petrijevih zdjelica s Čapek podlogom, etilni alkohol, razvijena čista kultura gljive *Botrytis cinerea*, plamenik i laboratorijska igla. Površinski sam dezinficirala uključeni laminarij. Na dezinficiranu površinu laminarija sam poslagala Petrijeve zdjelice po s različitim hranjivim podlogama (slika 7). Prvo sam radila naciepljivanje gljive na PDA podlogu, zatim na podloge od rajčice i mrkve i na kraju na Čapek podlogu. Naciepljivanje sam izvela tako što sam prvo sterilizirala iglu na plameniku. Iglu sam držala na plameniku dok se nije užarila, zatim se ohladila i tada sam uzela zdjelicu u kojoj se nalazila gljiva

Botrytis cinerea, sastrugala sam micelij i nacjepila ga na sredinu Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom. Postupak sam ponovila za sve hranjive podloge. Nakon nacjepljivanja na različite podloge, Petrijeve zdjelice sam stavila u termostatsku komoru na različite temperature: 15°C, 20°C i 25°C. Razvoj gljive sam pratila 9 dana, vremenski razmak između nacjepljivanja i prvog mjerenja je bio 3 dana, između prvog i drugog mjerenja također 3 dana kao i između drugog i trećeg mjerenja. Mjerenje razvoja gljive *Botrytis cinerea* na različitim hranjivim podlogama sam obavljala uz pomoć ravnala kojim sam mjerila od sredine nacjepljenog dijela gljive do ruba micelija.



Slika 7. Petrijeve zdjelice u komori za rad u čistom

2.4. PRIPREMA HRANJIVIH PODLOGA

Prije pripreme hranjivih podloga potrebno je sterilizirati Petrijeve zdjelice. Zdjelice se umotavaju po 4 komada u novinski papir i stavljaju u autoklav koji omogućuje vlažnu sterilizaciju. Sterilizacija se vrši 20 minuta na temperaturi 121°C i 1,5 bara. Nakon hlađenja zdjelice se vade i slažu na stol, a zatim se u njih razlijeva pripremljena hranjiva podloga. Priprema svake hranjive podloge se obavlja po receptu, a nakraju pripreme treba podesiti njezinu pH vrijednost. Za potrebe našeg pokusa pH vrijednost smo podesili na 6,5. Hranjive podloge se do uporabe čuvaju u hladnjaku na 4°C.

PODLOGA OD MRKVE

Za pripremu podloge od mrkve potrebno je 20g mrkve izrezane na kolutiće koju se ostavi namakati 1 sat u litri destilirane vode. Nakon toga mrkva se kuha 5 minuta, profiltrira se kroz filter papir, dodaje se 20g agara te zatim dobro izmućka ili protrese. Stavi se na autoklaviranje 20 minuta na 121°C i 1,5 bar.

PODLOGA PO ČAPEKU

Podloga po Čapeku je sintetska podloga za čiju pripremu je potrebno: 2g NaNO_3 , 1g K_2HPO_4 , 0,5g MgSO_4 , 0,5g KCl , 0,01g FeSO_4 , 30g saharoze, 20g agara i 1l destilirane vode. Podloga se sterilizira u autoklavu na 1,5 bar 121 °C 20 minuta.

PODLOGA OD RAJČICE

Za pripremu podloge od rajčice potrebno je 200ml soka od rajčice, 20g agara i 1l destilirane vode. Sastojci se dobro promiješaju i zatim se podloga sterilizira u autoklavu 20 minuta na 121°C i 1,5 bar.

PDA PODLOGA

Za pripremu PDA podloge potrebno je 42g gotove PDA podloge u koju dodamo 4g tehničkog agara te sve promiješamo s 1 l destilirane vode. Podloga se autoklavira na 121°C u trajanju 20 minuta.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. BIO-TEST NA JAGODAMA

Razvoj simptoma bolesti uzrokovanih gljivom *Botrytis cinera* na jagodi sam pratila tijekom tri dana na temperaturama 5°C, 15°C i 25°C. U tablici 1 prikazani su rezultati provedenog testa. Na inokuliranim jagodama ostavljenim na temperaturi 5°C kroz tri dana nije došlo niti do pojave početnih simptoma bolesti, dok je na temperaturi 15°C treći dan došlo do pojave vodenastih pjega što je prvi simptom razvoja sive plijesni (slika 8). Na temperaturi 25°C prvi simptomi razvili su se već drugi dan od inokulacije, a treći dan je utvrđena trulež na gotovo cijelom plodu. Na slici 9 prikazan je tipičan simptom sive plijesni na jagodama. Dakle, razvoj gljive bio je najbrži pri temperaturi 25°C što je u skladu s podacima iz literature te je takav rezultat u provedenom istraživanju bio za očekivati. Radman (1978.) i Ciglar (1978.) navode da su optimalne temperature za razvoj *Botrytis cinerea* između 20 i 30°C dok Jurković i Ćosić (2004.) navode da su optimalne temperature za razvoj sive plijesni između 20 i 25°C.

Tablica 1. Razvoj simptoma sive plijesni na jagodi pri različitim temperaturama

Temperatura	Prvi dan	Drugi dan	Treći dan
Hladnjak 5°C	-	-	-
Komora 15°	-	-	Početak truleži, vodenaste pjege
Sobna temperatura 25°C	-	Pojava početnih simptoma	Potpuno propadanje jagoda



Slika 8. Vodenaste pjege na jagodama (Katedra za fitopatologiju)



Slika 9. Siva trulež jagoda (Katedra za fitopatologiju)

2.2. UTJECAJ ETERIČNIH ULJA NA RAZVOJ GLJIVE BOTRYTIS CINEREA

Utjecaj eteričnih ulja na porast gljive *Botrytis cinerea* odnosno na veličinu zone inhibicije na temperaturi 20°C prikazan je u tablici 2, a na temperaturi 25°C u tablici 3.

Nakon trećeg dana (slika 10) na temperaturi uzgoja 20°C prosječna zona inhibicije u kontroli iznosila je 0,25 cm dok se u tretmanima s primjenom eteričnih ulja kretala od 0,38 cm (gorka naranča) do 2,77 cm (kim). Već nakon tri dana utvrđene su statistički značajne razlike u veličini zone inhibicije između kontrole i 9 apliciranih eteričnih ulja te statistički vrlo značajne razlike između kontrole i 8 eteričnih ulja.

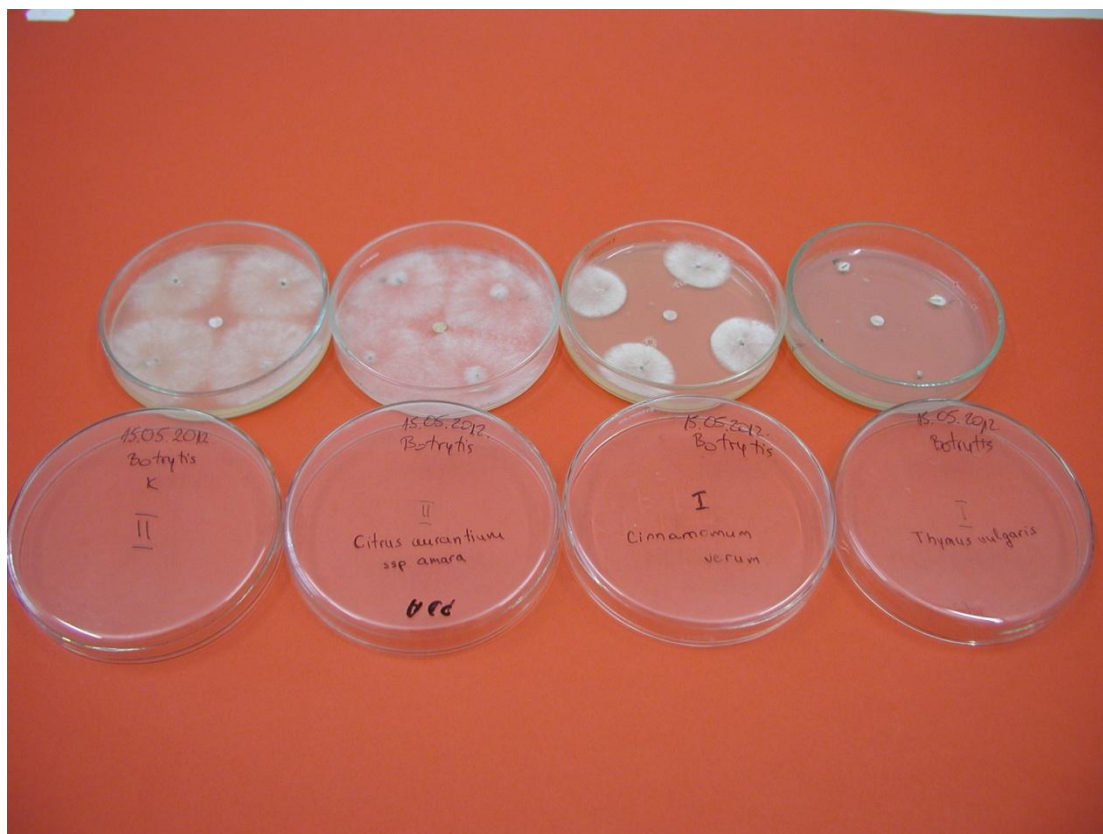
Nakon šestog dana (slika 11) prosječna zona inhibicije u kontroli iznosila je 0,04 cm, a u tretmanima s primjenom eteričnih ulja kretala se od 0 cm (lavanda, ružmarin, kadulja, gorka naranča, bor) do 2,75 cm (timijan). Zona inhibicije bila je statistički značajno veća od kontrole kod primjene eteričnog ulja anisa, a statistički vrlo značajno veća kod primjene metvice, timijana i kima.

Devetog dana od inokulacije (slika 12) samo su ulja timijana, klinčićeveca, kima i cimeta djelovala inhibitorno sa zonom inhibicije između 0,12 cm (klinčićevec) i 1,37 cm (timijan). Statistički značajno veća zona inhibicije od kontrole utvrđena je za ulje kima, a statistički vrlo značajno veća za ulje timijana.

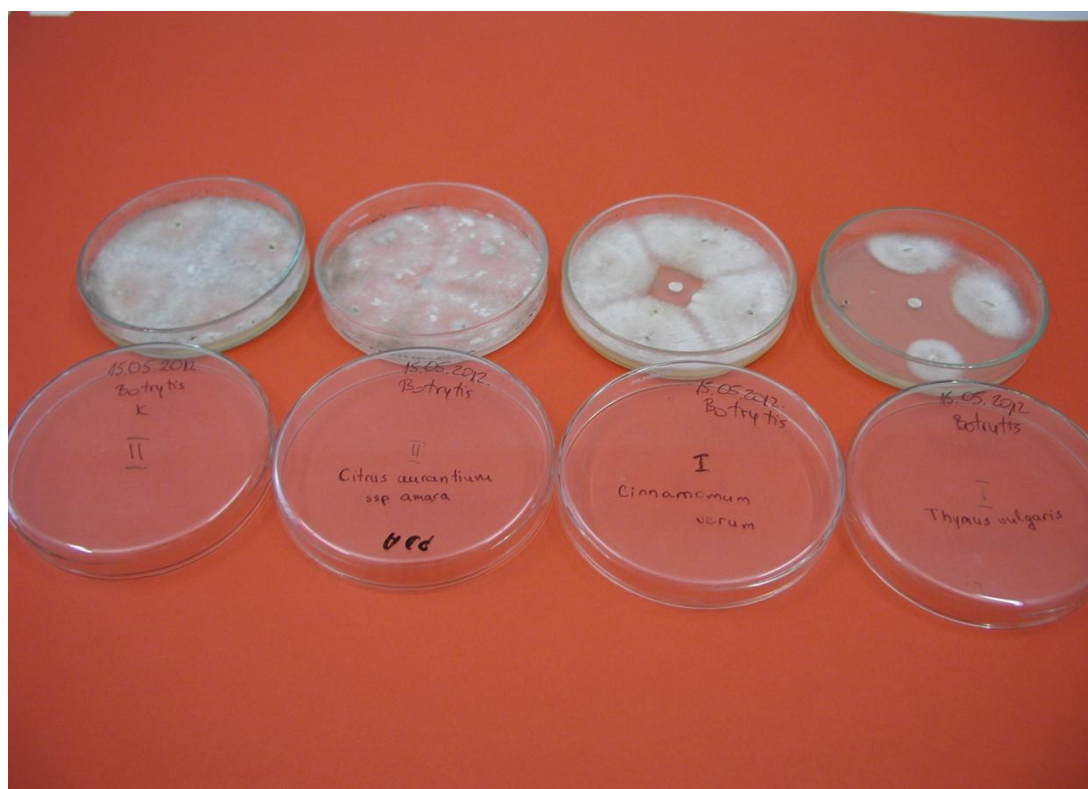
Veći broj autora ističe dobro antifungalno djelovanje eteričnih ulja na *Botrytis cinerea*. Abdolahi i sur. (2010.) navode da su ulja *Foeniculum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis* i *Ocimum basilicum* pokazala vrlo jak antigungalni efekt na porast micelija. Ulje *Magnolia lilflora* potpuno je inhibirala porast *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum capsici*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* i *Fusarium solani* (Bajpai i Kang, 2012.).

Tablica 2. Zona inhibicije (cm) pri temperaturi 20°C

ETERIČNA ULJA	3.DAN					6.DAN					9.DAN				
	PONAVLJANJE					PONAVLJANJE					PONAVLJANJE				
	1.	2.	3.	4.	\bar{x}	1.	2.	3.	4.	\bar{x}	1.	2.	3.	4.	\bar{x}
<i>Mentha x piperita</i> (metvica)	2,0	1,95	2,4	2,5	2,21	0	0	2,25	2,25	1,13	0	0	0	0	0
<i>Lavandula angustifolia ssp.</i> <i>Angustifolia</i> (lavanda)	2,55	2,45	2,4	2,5	2,48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Thymus vulgaris</i> (timijan)	2,55	2,45	2,75	2,75	2,62	2,05	1,35	2,75	2,75	2,22	0	0	2,75	2,75	1,37
<i>Eugenia caryophyllus</i> (klinčićevac)	1,65	1,7	1,6	1,7	1,66	0,55	0,6	0,55	0,65	0,57	0,1	0,25	0	0,15	0,12
<i>Rosmarinus officinalis</i> (ružmarin)	0	0	1,1	1,2	0,57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salvia officinalis</i> (kadulja)	2,2	1,75	1,55	1,6	1,77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Carum carvi</i> (kim)	2,8	2,8	2,65	2,85	2,77	2,75	2,75	2,15	2,55	2,55	2,1	1,7	0	0	0,95
<i>Pimpinella anisum</i> (anis)	2,5	2,55	2,75	2,7	2,62	0,95	1,2	0,6	0,55	0,82	0	0	0	0	0
<i>Cinnamomum verum</i> (list cimeta)	1,55	1,65	1,75	1,65	1,65	0,65	0,55	0,7	0,7	0,65	0,25	0,15	0,3	0,25	0,24
<i>Citrus aurantium ssp. amara</i> (gorka naranča)	0,3	0,5	0,5	0,2	0,38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pinus sylvestris</i> (bor)	0,6	0,6	0,6	0,7	0,62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrola	0,3	0,1	0,55	0,05	0,25	0,15	0	0	0	0,04	0	0	0	0	0
LSD 0,05 0,01	0,35 0,45					0,61 0,81					0,78 1,02				



Slika 10. Utjecaj eteričnih ulja na porast *B. cinerea* pri temperaturi 20°C (3. dan)



Slika 11. Utjecaj eteričnih ulja na porast *B. cinerea* pri temperaturi 20°C (6. dan)



Slika 12. Utjecaj eteričnih ulja na porast *B. cinerea* pri temperaturi 20°C (9. dan)

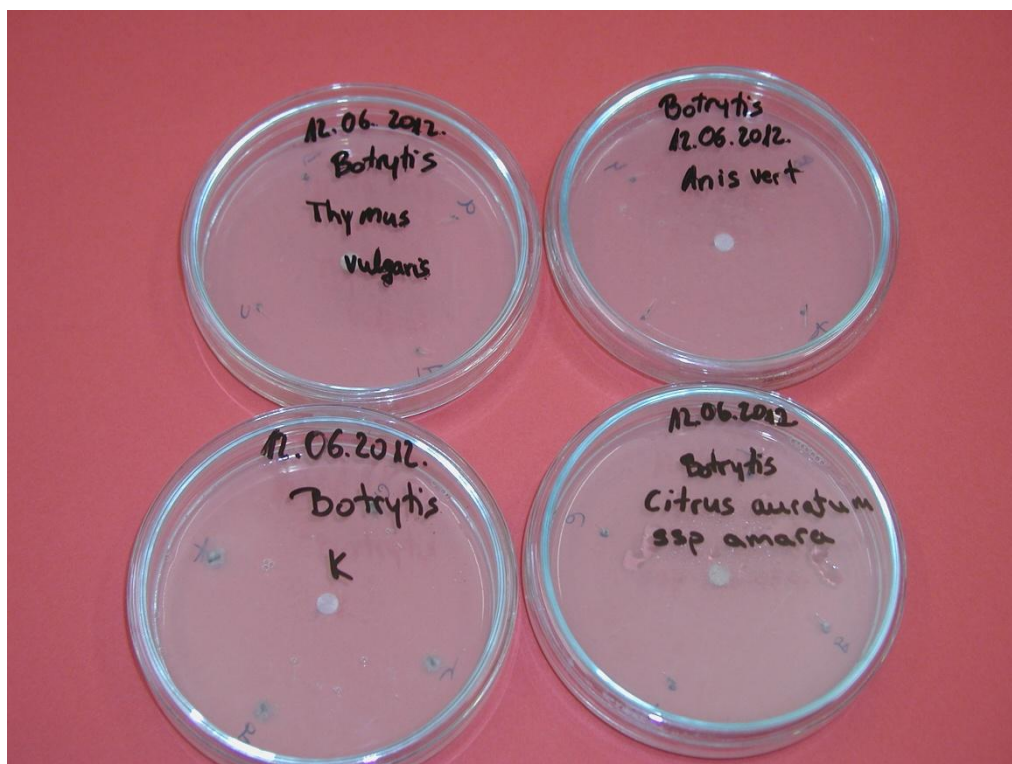
Nakon trećeg dana (slika 13) na temperaturi uzgoja 25°C prosječna zona inhibicije u kontroli iznosila je 2,26 cm dok se u tretmanima s primjenom eteričnih ulja kretala od 2,41 cm (klinčićevec) do 2,77 cmm (metvica). Statistički značajno veću zone inhibicije u odnosu na kontrolu imalo je 10 apliciranih eteričnih ulja odnosno statistički vrlo značajno veću 9 eteričnih ulja.

Šestog dana od naciepljivanja (slika 14) zona inhibicije nakon aplikacije eteričnih ulja bora (1,3 cm), klinčićeveca (1,5 cm) i ružmarina (1,39 cm) nije bila statistički značajno veća u odnosu na kontrolu (1,24 cm). Statistički vrlo značajno veća u odnosu na kontrolu bila je zona inhibicije u svim ostalim varijantama pokusa i kretala se između 2,04 cm (gorka naranča) i 2,77 cm (metvica).

Devetog dana od naciepljivanja (slika 15) zona inhibicije u kontroli je iznosila 0,94 cm, a u tretmanima s eteričnim uljima između 0 (ružmarin i kadulja) i 2,77 cm (metvica). Statistički vrlo značajno veća zona inhibicije bila je kod aplikacije ulja metvice, timijana, kima i cimeta.

Tablica 3. Zona inhibicije (cm) pri temperaturi 25°C

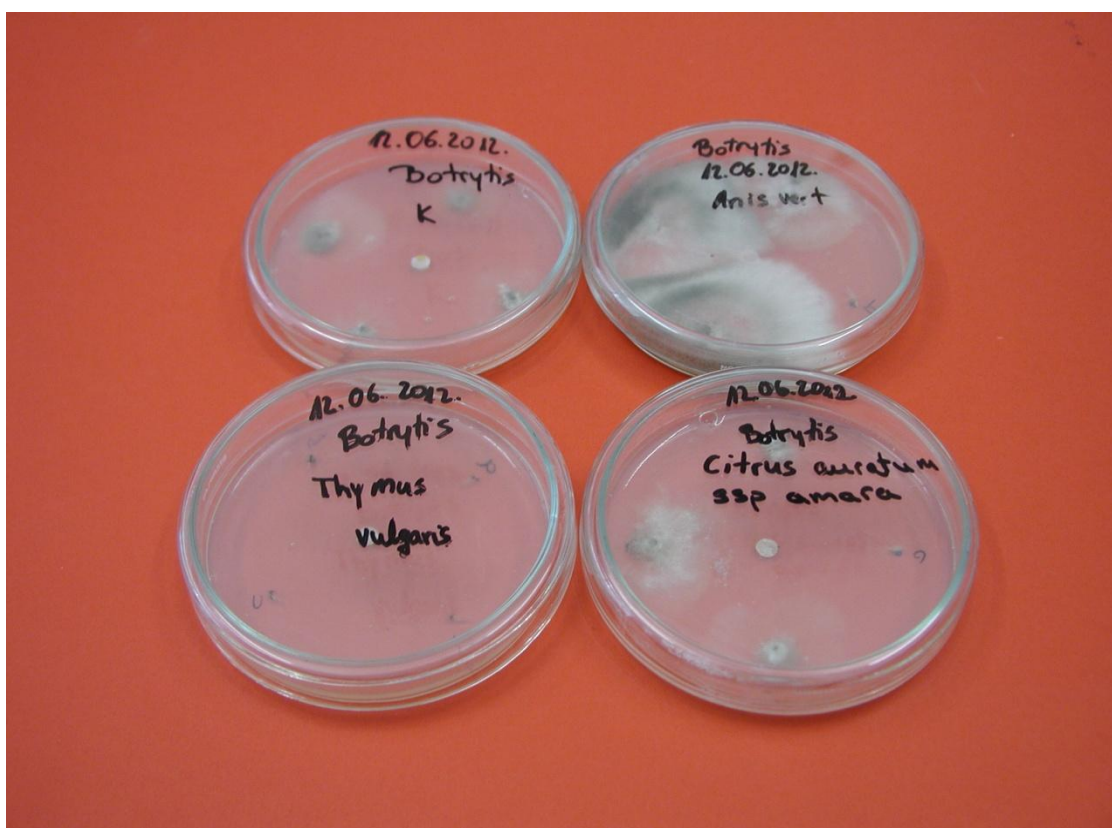
ETERIČNA ULJA	3.DAN					6.DAN					9.DAN				
	PONAVLJANJE					PONAVLJANJE					PONAVLJANJE				
	1.	2.	3.	4.	\bar{x}	1.	2.	3.	4.	\bar{x}	1.	2.	3.	4.	\bar{x}
<i>Mentha x piperita</i> (metvica)	2,85	2,75	2,65	2,85	2,77	2,85	2,75	2,65	2,85	2,77	2,85	2,75	2,65	2,85	2,77
<i>Lavandula angustifolia ssp.</i> <i>Angustifolia</i> (lavanda)	2,65	2,7	2,8	2,65	2,69	2,45	2,7	2	1,95	2,27	0,85	0,7	0	0	0,39
<i>Thymus vulgaris</i> (timijan)	2,8	2,75	2,75	2,75	2,76	2,8	2,75	2,75	2,75	2,76	2,8	2,75	2,75	2,75	2,76
<i>Eugenia caryophyllus</i> (klinčićevac)	2,4	2,25	2,35	2,6	2,41	1,3	1,3	1,35	2,05	1,5	0,65	1,0	0,7	1,1	0,86
<i>Rosmarinus officinalis</i> (ružmarin)	2,55	2,8	2,55	2,65	2,64	1,3	2,1	1,15	1	1,39	0	0	0	0	0
<i>Salvia officinalis</i> (kadulja)	2,85	2,7	2,75	2,7	2,75	2,2	2,2	1,85	2,4	2,16	0	0	0	0	0
<i>Carum carvi</i> (kim)	2,65	2,85	2,65	2,85	2,75	2,65	2,85	2,65	2,85	2,75	2,65	2,85	2,65	2,85	2,75
<i>Pimpinella anisum</i> (anis)	2,6	3,0	2,85	2,85	2,82	2,05	2,6	2,85	2,85	2,59	0	1,5	2,85	2,85	1,8
<i>Cinnamomum verum</i> (list cimeta)	2,6	2,8	2,5	2,95	2,71	2,6	2,8	2,2	2,95	2,64	2,6	2,8	2,2	1,75	2,34
<i>Citrus aurantium ssp. amara</i> (gorka naranča)	2,0	2,65	2,85	2,65	2,54	1,05	2,25	2,6	2,25	2,04	0	2,05	0,95	1,9	1,22
<i>Pinus sylvestris</i> (bor)	2,55	2,5	2,55	2,6	2,55	1,6	1,8	0,8	1,0	1,3	0,05	0	0	0	0,01
Kontrola	2,45	2,4	2,05	2,15	2,26	1,15	0,9	1,3	1,6	1,24	0,9	0	1,35	1,5	0,94
LSD 0,05	0,24					0,51					0,77				
0,01	0,29					0,67					1,01				



Slika 13. Utjecaj eteričnih ulja na porast *B. cinerea* pri temperaturi 25°C (3. dan)



Slika 14. Utjecaj eteričnih ulja na porast *B. cinerea* pri temperaturi 25°C (6. dan)



Slika 15. Utjecaj eteričnih ulja na porast *B. cinerea* pri temperaturi 25°C (9. dan)

3.3. UTJECAJ HRANJIVIH PODLOGA I TEMPERATURE NA RAZVOJ GLJIVE *BOTRYTIS CINEREA*

Utjecaj hranjivih podloga (njihovog sastava) i temperatura uzgoja, kao i svjetlosnog režima i kiselosti podloge od velikog je značenja za brzinu porasta micelija i njegov izgled (Svitlica, 2010.). Rezultati istraživanja utjecaja četiri hranjive podloge i tri temperature uzgoja prikazani su u tablicama 4, 5 i 6. Najslabiji razvoj utvrdili smo na 15°C, dok je razvoj gljive na 20 i 25°C bio podjednako brz. Najbolji razvoj *Botrytis cinerea* utvrdili smo na PDA podlozi i podlozi od rajčice na kojima je devetog dana od naciepljivanja micelij gljive potpuno je ispunio Petrijeve zdjelice promjera 9 cm na svim ispitivanim temperaturama izuzev na PDA podlozi na 15°C (tablica 4). Jedino se na PDA podlozi razvio gust sivi micelij dok je na preostale tri podloge micelij bio slabo razvijen i svjetlije boje.

Tablica 4. Porast *B. cinerea* (cm) na različitim hranjivim podlogama pri temperaturi 15°C

PODLOGA	3. DAN				6.DAN				9.DAN			
	Ponavljjanje				Ponavljjanje				Ponavljjanje			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
PDA podloga	-	-	-	-	2,8	3,4	3,0	2,7	8,7	9,0	8,6	9,0
Podloga od rajčice	+	+	-	-	3,1	2,3	3,6	3,5	9,0	9,0	9,0	9,0
Podloga od mrkve	-	-	-	-	0,6	1,1	0,8	1,0	7,8	8,4	8,5	7,9
Čapek agar	+	+	-	-	1,0	2,0	1,5	1,5	6,7	7,6	7,3	7,0

Tablica 5. Porast *B. cinerea* (cm) na različitim hranjivim podlogama pri temperaturi 20°C

PODLOGA	3. DAN				6.DAN				9.DAN			
	Ponavljjanje				Ponavljjanje				Ponavljjanje			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
PDA podloga	+	-	-	-	7,0	6,8	7,1	6,5	9,0	9,0	9,0	9,0
Podloga od rajčice	1,0	1,0	+	-	7,6	8,0	6,7	7,3	9,0	9,0	9,0	9,0
Podloga od mrkve	+	+	-	-	1,0	2,9	2,3	1,8	6,2	8,0	7,8	8,3
Čapek agar	+	+	+	+	6,0	5,0	1,9	5,0	9,0	9,0	9,0	9,0

Tablica 6. Porast *B. cinerea* (cm) na različitim hranjivim podlogama pri temperaturi 25°C

PODLOGA	3. DAN				6.DAN				9.DAN			
	Ponavljjanje				Ponavljjanje				Ponavljjanje			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
PDA podloga	+	+	-	-	5,7	7,5	7,1	6,1	9,0	9,0	9,0	9,0
Podloga od rajčice	1,2	1,3	0,5	0,9	8,0	8,1	7,3	7,6	9,0	9,0	9,0	9,0
Podloga od mrkve	+	-	-	-	2,5	2,0	2,8	2,6	7,0	6,5	6,8	7,9
Čapek agar	+	+	+	+	1,4	1,5	2,5	3,2	6,0	6,8	7,3	7,5

4. ZAKLJUČAK

Na temelju laboratorijskih istraživanja gljive *Botrytis cinerea* može se zaključiti:

- optimalna temperatura za razvoj sive plijesni je 25°C pri čemu već nakon tri dana bolest zahvaća veći dio ploda jagode
- na temperaturi 5°C niti nakon tri dana nema razvoja simptoma bolesti
- eterična ulja timijana i kima imaju najbolje antifungalno djelovanje na istraživanu gljivu pri čemu je zona inhibicije na obje ispitivane temperature (20 i 25°C) statistički značajno veća u odnosu na kontrolu
- eterična ulja imala su bolje fungistatično djelovanje na temperaturi 25°C
- najbolji razvoj micelija gljive utvrđen je na PDA podlozi i podlozi od rajčice.

5. POPIS LITERATURE

1. Abdolahi, A., Hassani, A., Ghosta, Y. et al. (2010) Study on the potential use of essential oils for decay control and quality preservation of Tabarzeh table grape. *Journal of Plant Protection Research* 50(1), 45-52.
2. Bajpai, V.K., Kang, S.C. (2012) *In vitro* and *in vivo* inhibition of plant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J. Agr. Sci. Tech.* 14, 845-856.
3. Ciglar, I. (1998.): Integrirana zaštita voćaka i vinograda. Zrinski d.d., Čakovec.
4. Cvjetković, B. (2010.): Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze. Zrinski d.d., Čakovec.
5. Ćosić, J. Skripta iz fitopatologije (Stručni studij). <http://pfos.hr/~jcosic/>, 6.4.2013.
6. Ćosić, J., Parađiković, N., Bilić, I., Poštić, J. (2009.): Gljivične bolesti rajčice u hidroponskom uzgoju. *Glasilo biljne zaštite*, 4:260-263.
7. Jurković, D., Ćosić, J. (2004.): Bolesti suncokreta. U knjizi Vratarić M. i sur. "Suncokret *Helianthus annuus* L.", str. 283-328. Poljoprivredni institut Osijek.
8. Jurković, D., Ćosić, J., Vrandečić, K. (2010): Bolesti cvijeća i ukrasnog bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
9. Kišpatić, J., Maceljski, M. (1991.): Zaštita vinove loze. Zagreb.
10. Radman, Lj. (1978.): Bolesti ratarskih kultura. Sarajevo.
11. Svitlica, B. (2010.): Patogenost *Fusarium* vrsta za kukuruz. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
12. Topolovec-Pintarić, S. (2000.): Urođena i stečena otpornost *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. na botricide u vinogradima i suodnos rezistentnih patotipova. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.

6. SAŽETAK

Razvoj sive plijesni uzrokovane gljivom *Botrytis cinera* na jagodi praćen je tijekom tri dana na temperaturama 5°C, 15°C i 25°C te je utvrđeno da je razvoj bolesti najbrži na 25°C. Na toj temperaturi su prve promjene na plodu jagode uočene već 24 sata od inokulacije dok je nakon tri dana plod bio potpuno zahvaćen bolešću. Utjecaj 11 vrsta eteričnih ulja na razvoj *B. cinerea* praćen je na temperaturama 20 i 25°C. Najbolje antifungalno djelovanje na istraživanu gljivu na obje temperature imala su ulja timijana i kima. Praćenjem utjecaja hranjivih podloga (PDA, Čapek agar, podloga od mrkve, podloga od rajčice) na rast gljive utvrdili smo da je najbolji razvoj micelija utvrđen na PDA podlozi i podlozi od rajčice.

7. SUMMARY

Development of grey mould caused by *Botrytis cinerea* on strawberry was followed during three day period on temperatures 5°C, 15°C and 25°C, and it was determined that the highest disease development was on 25°C. On that temperature first changes on the strawberry fruit were noticed 24 hours after inoculation, and after 3 days fruit was completely covered with disease. Influence of 11 essential oils on development of *B. cinerea* was followed on temperatures 20 i 25°C. The best antifungal activity on both temperatures had oils of thyme and cumin. Investigating the influence of media (PDA, Čapek, carrot agar and tomato agar) on fungal development it was determined that the best mycelial development is on PDA and tomato agar.

8. POPIS TABLICA

1. Razvoj simptoma sive plijesni na jagodi pri različitim temperaturama.....	11
2. Zona inhibicije (cm) pri temperaturi 20°C.....	14
3. Zona inhibicije (cm) pri temperaturi 25°C.....	17
4. Porast <i>B. cinerea</i> (cm) na različitim hranjivim podlogama pri temperaturi 15°C.....	20
5. Porast <i>B. cinerea</i> (cm) na različitim hranjivim podlogama pri temperaturi 20°C.....	20
6. Porast <i>B. cinerea</i> (cm) na različitim hranjivim podlogama pri temperaturi 25°C.....	21

9. POPIS SLIKA

Slika 1. Siva plijesan na stabljici suncokreta (Katedra za fitopatologiju).....	2
Slika 2. Siva plijesan na vinovoj lozi (Katedra za fitopatologiju).....	4
Slika 3. Konidiofori i konidije <i>Botrytis cinerea</i> (Katedra za fitopatologiju).....	5
Slika 4. Inokulacija jagoda.....	6
Slika 5. Inokulacija jagoda.....	7
Slika 6. Eterična ulja.....	8
Slika 7. Petrijeve zdjelice u komori za rad u čistom.....	9
Slika 8. Vodenaste pjege na jagodama (Katedra za fitopatologiju).....	11
Slika 9. Siva trulež jagoda (Katedra za fitopatologiju).....	12
Slika 10. Utjecaj eteričnih ulja na porast <i>B. cinerea</i> pri temperaturi 20°C (3. dan).....	15
Slika 11. Utjecaj eteričnih ulja na porast <i>B. cinerea</i> pri temperaturi 20°C (6. dan).....	15
Slika 12. Utjecaj eteričnih ulja na porast <i>B. cinerea</i> pri temperaturi 20°C (9. dan).....	16
Slika 13. Utjecaj eteričnih ulja na porast <i>B. cinerea</i> pri temperaturi 25°C (3. dan).....	18
Slika 14. Utjecaj eteričnih ulja na porast <i>B. cinerea</i> pri temperaturi 25°C (6. dan).....	18
Slika 15. Utjecaj eteričnih ulja na porast <i>B. cinerea</i> pri temperaturi 25°C (9. dan).....	19

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josia Jurja Strossmayera

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Završni rad

Utjecaj hranjivih podloga i eteričnih ulja na razvoj *Botrytis cinerea*

Influence of nutrition media and essential oils on the development of *Botrytis cinerea*

Ana-Marija Damjanović

Sažetak:

Razvoj sive plijesni uzrokovane gljivom *Botrytis cinera* na jagodi praćen je tijekom tri dana na temperaturama 5°C, 15°C i 25°C te je utvrđeno da je razvoj bolesti najbrži na 25°C. Na toj temperaturi su prve promjene na plodu jagode uočene već 24 sata od inokulacije dok je nakon tri dana plod bio potpuno zahvaćen bolešću. Utjecaj 11 vrsta eteričnih ulja na razvoj *B. cinerea* praćen je na temperaturama 20 i 25°C. Najbolje antifungalno djelovanje na istraživanu gljivu na obje temperature imala su ulja timijana i kima. Praćenjem utjecaja hranjivih podloga (PDA, Čapek agar, podloga od mrkve, podloga od rajčice) na rast gljive utvrdili smo da je najbolji razvoj micelija utvrđen na PDA podlozi i podlozi od rajčice.

Ključne riječi: *Botrytis cinera*, jagode, eterična ulja, hranjiva podloga

Summary: Development of grey mould caused by *Botrytis cinera* on strawberry was followed during three day period on temperatures 5°C, 15°C and 25°C, and it was determined that the highest disease development was on 25°C. On that temperature first changes on the strawberry fruit were noticed 24 hours after inoculation, and after 3 days fruit was completely covered with disease. Influence of 11 essential oils on development of *B. cinerea* was followed on temperatures 20 i 25°C. The best antifungal activity on both temperatures had oils of thyme and cumin. Investigating the influence of media (PDA, Čapek, carrot agar and tomato agar) on fungal development it was determined that the best mycelial development is on PDA and tomato agar.

Key words: *Botrytis cinera*, strawberry, essential oils, nutrition media

Datum obrane: